

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520121153124

UDC _____



硕 士 学 位 论 文

ATM/NF-kappaB 通路在 IL-6 促肺癌细胞上 皮间质转换并增强转移的作用研究

IL-6 promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and
increases metastasis in lung cancer cells via the activation of
ATM/NF-kappaB pathway

姜伊娜

指导教师姓名: 高丰光 教授

专 业 名 称: 免 疫 学

论文提交日期: 2015 年 7 月

论文答辩时间: 2015 年 7 月

学位授予日期: 2015 年 9 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(高丰光)课题(组)的研究成果,获得(高丰光)课题(组)经费或实验室的资助,在(高丰光)实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☐ 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

缩略语索引

缩略语	英文全名	中文全名
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
SCLC	Small cell lung cancer	小细胞肺癌
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kinase	共济失调毛细血管扩张 突变蛋白激酶
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	反转录聚合酶链式反 应
Real-Time PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction	实时定量聚合酶链反 应
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	上皮间充质转化
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
BSA	Bovine serum albumin	小牛血清白蛋白
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
Tris	Trihydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
TBS	Tris Buffered Saline	Tris 缓冲液
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylenediamine tracetac acid	乙二胺四乙酸
MMP	Matrix metallopeptidase	基质金属蛋白酶
PE	Phycoerythrin	藻红蛋白
DAB	3, 3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺显色液

DAPI	Diamidino-phenyl-indole	二脒基苯基吲哚
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
TAE	Tris acetate-EDTA buffer	Tris-乙酸-EDTA 缓冲
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B	核因子 kappa B
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
CSFE	Carboxyfluoresceindiacetatesuccinimidyl ester	羧基荧光素二醋酸盐 琥珀酰亚胺酯

摘要

【背景和目的】恶性肿瘤的侵袭和转移是导致治疗失败的关键因素。IL-6作为重要的促炎因子,参与了肿瘤发生发展的全过程,是肿瘤相关炎症的关键分子。我们之前的研究发现,IL-6可以在肺癌中激活ATM-NF- κ B通路、促进MMPs的表达及活性,并可以介导肿瘤细胞的侵袭和迁移。肿瘤转移涉及肿瘤微环境各组分的相互作用,包括肿瘤细胞自身发生了形态、极性、能动性改变,即上皮间质转换(EMT)的发生。EMT赋予细胞迁移和侵袭以及诱导为干细胞的性质,阻止了细胞的衰老和凋亡,并促成了免疫抑制微环境的形成。间质状态与肿瘤迁移到远处器官并维持“干性”密切相关,给它们在侵袭起始时继发分化为多种细胞类型提供了可能。但到目前为止,炎症因子IL-6是否诱导肺癌细胞发生EMT能力的影响及通过何种途径诱导EMT转变尚不清楚。

【方法】首先以Real-time PCR、ELISA技术检测NCI-H446、A549、LTEP-a-2等几种肺癌细胞系的IL-6表达水平,及以Transwell检测其相应的迁移能力;其次,进行细胞爬片法,以光学显微镜和激光共聚焦显微镜观察肺癌细胞在IL-6的刺激下的细胞形态的变化情况和EMT相关指标的变化情况;再对IL-6表达高低不同的几种肺癌细胞系,分别给予外源性IL-6刺激或以siRNA沉默技术抑制IL-6表达,以Real-time PCR观察EMT相关指标的变化情况;再以ATM抑制剂、siRNA沉默技术抑制相应通路激酶的活性后,以Real-time PCR和激光共聚焦显微镜观察相应激酶在IL-6促肺癌EMT的作用;将NCI-H446、A549细胞进行siRNA沉默ATM后经尾静脉注射到小鼠体内,再给予IL-6刺激,观察肺组织和肝组织成瘤情况,以免疫组化技术检测ATM的磷酸化水平以及EMT指标;最后对来自临床的有或无肺癌远处转移的73例标本进行免疫组化检测ATM磷酸化和EMT指标变化情况,验证细胞学水平和动物实验得到的规律。

【结果】(1) IL-6在肺癌中可明显促进肿瘤细胞EMT的发生;(2)在动物实验中发现,静脉注射IL-6可促使ATM磷酸化;(3)用ATM激酶抑制剂CGK-733或siRNA基因沉默技术阻遏ATM活性可使IL-6所诱导的EMT各项指标明显得到抑制,并相应抑制肿瘤转移的发生;(4)在动物实验中,IL-6可以促进肿瘤迁移及EMT的发生,ATM激酶抑制剂CGK-733或siRNA基因沉默技术抑制ATM活性

可阻遏这种趋势；（5）在发生肺癌远处转移的患者的标本中IL-6高表达，ATM明显激活，且与EMT指标变化趋势相一致。我们对73例人的肿瘤标本进行研究，通过免疫组化的检测技术，发现ATM在47例肿瘤中都被激活，且磷酸化的ATM在有远处转移的肿瘤中相对高表达。证明ATM在调控肿瘤转移中发挥重要作用。提示IL-6通过激活ATM -NF- κ B通路促进EMT的发生，增强肿瘤迁移。

【结论】 本课题以siRNA干扰或激酶抑制剂的使用研究ATM -NF- κ B通路在促炎因子IL-6促肺癌细胞发生EMT转变中的研究，明确了ATM -NF- κ B通路在IL-6促肺癌转移中的关键角色，并在动物实验和临床标本中证实了这一点，为预防肺癌化疗后肿瘤转移提供了潜在的治疗靶点。

关键词： 白介素6 共济失调毛细血管扩张突变基因 上皮间质转换 肺癌转移

Abstract

Background and Objectives: The invasion and metastasis of malignant tumor always lead to treatment failure. Inflammation was reported to have close relationship with carcinogenesis and metastasis. As an important proinflammatory cytokines, IL-6 is involved in the process of immunity, inflammatory, and the development of malignant tumor. IL-6 is a key component in maintaining the development of malignant tumor. Cancer cells exposed to IL-6 or which secrete the cytokine as an autocrine factor, show malignant features, such as an enhanced capacity to invade the extracellular matrix and an increased drug resistance. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), which is activated by DNA double break, was found to be activated by the treatment with IL-6. The previous study demonstrates that IL-6 is able to activate ATM-NF- κ B pathway, induce the MMPs expression and promote the invasion and migration of tumor cell in lung cancer. Besides tumor microenvironment participated in the invasion and metastasis of tumors, in the initial stage of invasion, the tumor itself has also undergone a corresponding shape, polarity and motility change and epithelial-mesenchymal transition occurs. The process of epithelial-mesenchymal transition (EMT), in addition to being an initiating event for tumor metastasis, is implicated in conferring several clinically relevant properties to disseminating cancer cells. EMT give cell migration and invasion capabilities, induce tumor cells into stem cells, prevent the senescence and apoptosis, and contribute to the formation of immunosuppressive microenvironment. Although previous studies show that ATM could be activated by IL-6 treatment and augments lung cancer chemotherapeutic resistance, the exact roles of ATM activation in proinflammatory cytokines such as IL-6 mediated epithelial-mesenchymal transition is still uncertain.

Method: In our study, lung cancer cell lines NCI-H446, A549, LTEP-a-2 and NCI-H520 were used as model to study the relationship of the levels of IL-6 and metastasis abilities. Firstly, we verified the level of IL-6 expression and the migration capability in different cell lines. Then, to silence or add IL-6 to high level or low level

of cell lines, the role of IL-6 in promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) was explored by light microscopes, confocal microscope or real-time PCR. Again, with siRNA transfection or inhibitors to inhibit ATM and p65 activities, the roles of ATM and p65 in IL-6 increased lung cancer cell metastasis were explored by real-time PCR and confocal microscope assay respectively. And then, a lung cancer-bearing model in Balb/c mice was used to evaluate the role of ATM in epithelial-mesenchymal transition and the metastasis of lung cancer. Finally, lung cancer tissues and clinical data of 73 patients were collected and the clinicopathological findings by HE and IHC for exploring the relationship between ATM, vimentin and tumor distant metastasis.

Result: In the present study, we demonstrate that the activation of ATM resulting from increased IL-6, plays a central role in augmented metastasis of lung cancer. This result was supported by the high level of IL-6 changing the cell polarity, promoting EMT and increasing cell migration abilities. Interestingly, ATM activation induced by IL-6 reveals not only the up-regulation of EMT but also increased cell migration ability. Most importantly, the *in vivo* test shows that the inhibition of ATM abrogates the effect of IL-6 on lung cancer metastasis. And the positive association between ATM phosphorylation and vimentin in relation to various clinicopathological characteristics was finally determined.

Conclusion: Taken together, all these findings demonstrated that pro-inflammatory cytokines such as IL-6 increases EMT via ATM/NF-kappaB pathway activation, augmenting cell migration ability, and contributing to lung cancer metastasis, indicating that ATM and NF-kappaB pathway are potential targets for the treatment of IL-6 associated lung cancer metastasis.

Key words: interleukin 6; ataxia-telangiectasia mutated; EMT; lung cancer metastasis

目 录

缩略语索引	I
摘 要.....	III
前 言.....	2
实验材料和方法	10
一、 实验材料.....	10
二、 实验方法.....	13
实验结果	23
一、 肺癌细胞系中 IL-6 的表达水平与其迁移能力正向相关	23
二、 IL-6 调节了细胞和集落的形态改变及上皮间质转换的发生	25
三、 ATM/NF- κ B 在 IL-6 促进 EMT 作用中扮演重要角色	27
四、 IL-6 促进肿瘤转移的作用在动物体内是 ATM-NF- κ B 依赖的	29
五、 IL-6 经由 ATM-NF- κ B 通路促进 EMT 在体内的发生	33
六、 激活的 ATM 激酶在人类肺癌组织中与过表达的 Vimentin 相关	36
讨 论	44
结 论	48
参考文献	49

Table of Contents

Abbreviations	I
Abstract.....	III
Introduction.....	2
Materials and Methods.....	10
I .Experimental material	10
II .Experimental Method	13
实验结果	23
I . The level of IL-6 were positively related to migration abilities in varied lung cancer cells	23
II .The expression of IL-6 is associated with EMT in lung cancer cells	25
III. ATM/NF-kappaB are involved in IL-6 induced epithelial–mesenchymal transition in vitro	27
IV. The activation of ATM/NF-κB pathway is involved in IL-6 increased lung cancer metastasis in vivo	29
V . IL-6 increased Epithelial-mesenchymal transition via ATM pathway in vivo	33
VI.ATM hyperactivation correlates with Elevated Vimentin in human lung cancer	36
Discussion	44
Conclusion	48
References	49

前 言

肺癌作为一种最常见的恶性肿瘤，导致了超过五分之一的癌症死亡，成为中国肿瘤的第一“杀手”。其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌患者 80%发病率。肺癌的转移复发是其难以治疗、术后成活率较低的关键原因之一，其中转移复发的关键环节为肿瘤微环境中免疫系统的演变。肺癌的免疫微环境状态反映了肺癌生长、迁移、侵袭等生物学性状。肺癌的进展和其周围免疫微环境相关，并随着肺癌发生发展而发生相互影响的动态过程。研究肺癌周围的免疫环境状态对肺癌侵袭转移的影响的作用机制对临床治疗有重大的意义。

一、 肺癌转移与肺癌细胞的上皮间质转换

肿瘤的浸润和转移的发生不仅涉及肿瘤微环境间质细胞的改变发挥作用，也与肿瘤细胞自身受间质细胞的作用密切相关，并在很大程度上影响了肿瘤患者的预后和生存。肺癌具有广泛的侵袭迁移的能力，这包括了个体性和整体性的双重特点（表1）。在肺癌转移的过程中，不仅包括细胞自身改变的形态学特点；也与位于基底膜表面的受体结合；细胞外基质的降解及基底膜的破坏；突破细胞外基质，侵入局部血管或淋巴管，在远处突破毛细血管，黏附于适宜的部位并诱导血管形成，最终形成转移灶^[1]。癌从上皮组织发生到发展成较高病理分级的恶性肿瘤，牵涉了原位侵袭和远处转移的发生。在原位侵袭的过程中，肿瘤细胞改变自身形态以接触其他细胞和胞外基质，继而突破基底膜侵袭周围组织。降解ECM相关的酶，包括MMPs和组织蛋白酶等，常常在肿瘤中高表达，进而在体内外促进迁移^[2]。

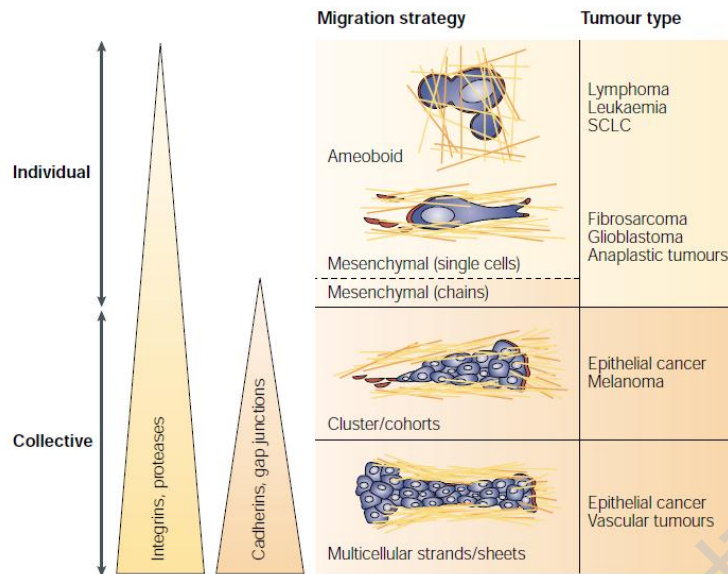


图1. 肿瘤的侵袭和迁移是个体性和整体性的协同作用

(Peter Friedl and Katarina Wolf, Nature 2003)

上皮间质转换(EMT)是指上皮细胞在形态学上发生向成纤维细胞或间充质细胞表型的转变并获得迁移的能力的过程,在多种组织器官的分化中起到重要作用。细胞通过EMT在胚胎中移动并建立特定分化的组织,而在胚胎发育中是一个有益的过程。不过近年的研究发现,EMT也在肿瘤转移中发挥关键性的作用^[3],它不仅能够促进组织修复,也可以通过一系列的机制导致器官的纤维化而促进肿瘤的发展。EMT赋予细胞迁移和侵袭以及诱导为干细胞的性质,阻止了细胞的衰老和凋亡,并促成了免疫抑制微环境的形成。间质状态与肿瘤迁移到远处器官并维持“干性”密切相关,给它们在侵袭起始时继发分化为多种细胞类型提供了可能^[3]。在肿瘤细胞EMT发生的过程中,移动的细胞极化而变得狭长,在细胞运动的前缘形成伪足,使之可以接触ECM的基质;继而,接触的部分产生牵引力使细胞前行^[4]。许多研究证明,肿瘤细胞的能动性牵涉到整合素相关信号、焦点接触的形成以及肌动蛋白依赖收缩性^[5,6]。在这个过程中,Cadherin家族的粘附分子对于生长发育过程中细胞的选择性聚集具有至关重要的作用^[7],与波形蛋白、纤黏蛋白(FN)等同样成为EMT发生的观察指标。E-cadherin是Cadherin家族的一员,它是一种钙依赖的跨膜糖蛋白,介导同型细胞间粘附,是维持正常内皮细胞表型的重要分子^[8]。癌细胞最具特征性的改变就是E-cadherin这个关键的胞间黏附分子的减少。通过与相邻的细胞形成粘着点,E-cadherin汇聚了内皮细胞并维持稳定。增加的E-cadherin有助于对抗侵袭转移,而减少它的表达就有可能改变这种

表型^[9,10]。Brabletz等人曾发现,在结肠癌中EMT发生在侵袭的前一步骤,它产生单个迁移细胞,这个细胞缺失E-cadherin的表达,这个过程与Wnt通路的下调协同作用,使基底膜选择性的丢失,且这个现象在实体瘤中重演^[11]。在甲状腺乳头状瘤和乳腺癌中亦有相似E-cadherin的表达变化。Perl等人证明E-cadherin 的减少在肿瘤的进展中是一个关键步骤,它是EMT发生的基础事件^[12]。N-cadherin主要集中在神经元、成纤维细胞以及其他间充质细胞中表达。它同样是一种跨膜糖蛋白,胞外段在相邻细胞间介导嗜同种受体反应,这个过程主要经由靠近氨基端的一段包含组氨酸-丙氨酸-缬氨酸(HAV)的氨基酸序列的肽段来调节^[13]。N-cadherin的表达主要和细胞的“攻击性”行为相关^[14,15],比如N-cadherin蛋白过表达后可诱导肿瘤细胞移动,从而促进肿瘤细胞迁移和侵袭。波形蛋白Vimentin是一种普遍存在的中间丝,主要存在于成纤维细胞和来自胚胎间充质的细胞,主要在核周形成网架,对核起机械性支撑作用,稳定其在细胞内的位置。波形蛋白参与了细胞粘附和迁移的过程,在具有EMT表型的软组织肉瘤和一些上皮癌中高表达,是EMT发生的重要标志之一^[16]。在宫颈癌中亦发现有vimentin 的增加和E-cadherin的减少^[11]。

EMT的发生可以被致癌基因的激活所调控,如K-Ras的突变,Her2的过表达等;它也可以被外界环境的刺激所触发。MOR可以调节阿片样物质和生长因子诱导的EGF受体信号通路,包括Src、Gab-1、PI3K、Akt和STAT3的激活,继而上调snail、slug和vimentin的表达^[17]。Snail家族成员slug在多种肿瘤如肺癌、乳腺癌中表达^[18], slug通过下调E-cadherin,上调MMP-2来促进肺癌的转移^[19]。TGF- β 刺激可以在A549细胞中激活Smad2 和Smad3,进而下调E-cadherin的表达,这种变化随刺激时间增加而愈加明显。RENG-YUN等人用AG490阻遏了STAT3的激活,抑制了TGF- β 1诱导的p-Smad3, Snail和MMP2,以及Smad介导的PAI-1启动子受体基因在肺癌A549和H1650细胞中的激活^[20]。在非小细胞肺腺癌中,转录因子PREP1^[21]及Trim28^[22]亦可通过调控TGF- β 通路来诱导EMT的发生和肿瘤转移。转录辅阻遏物TLE1可以在转录水平招募激活的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)到E-cadherin启动子而抑制E-cadherin的表达,进而促进肺腺癌细胞A549的EMT转变, TSA能够抑制HDAC活性,乙酰化水平增高,可以逆转这种变化趋势^[23]。IL-17通过激活NF- κ B通路可以上调ZEB1的表达,介导A549细胞EMT表型转变^[24]。

二、 白细胞介素-6在肺癌中发挥多种作用

在癌症产生和发展过程中,炎症一直是非常重要的协助因素。微环境中的基质细胞不仅为肿瘤的发生发展提供必要的物质条件,而且通过释放TNF- α 、IL-6、TGF- β 等促炎因子从而间接促进肿瘤的发展和转移^[25-28](图2)。其中促炎因子IL-6是一种多效性的细胞因子,可由多种细胞合成,包括活化的T细胞和B细胞、单核-巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞以及成纤维细胞等。最新研究也发现在受到TLR8配体或TLR4配体刺激时,人类中性粒细胞也能分泌产生IL-6^[29]。除此之外,IL-6的表达还受到内源性TNF- α 的影响,TNF- α 能够促进共激活因子 I κ B ζ 的合成,同时持续募集C/EBP β 并维持IL-6基因调控区域的组蛋白乙酰化修饰^[29]。IL-6提供了相当广泛的细胞和生理应答,包括免疫应答、炎症应答、造血作用、肿瘤发生,调节了细胞生存、增殖、分化和死亡。它作用的靶细胞很多,包括巨噬细胞、肝细胞、静止的T细胞、活化的B细胞和浆细胞等,曾称为B细胞刺激因子2(bsf-2)、B细胞分化因子(bcdf)、肝细胞刺激因子(hsf)等。它在许多恶性肿瘤中表达,是肿瘤微环境的重要组成部分。除了对癌细胞的细胞毒性作用之外,IL-6还发挥促癌作用。异常的IL-6信号可促进肿瘤细胞运动、入侵性,并增强癌细胞转移^[30,31]。在已知的研究中,STAT3在IL-6信号转导中起到主导地位,IL-6可以通过介导JAK2/STAT3信号通路促进多发性骨髓瘤以及肺癌的发生,多发性骨髓瘤的恶变B细胞既能产生IL-6,又能对IL-6发生应答^[32,33]。IL-6已被证明在Kaposi肉瘤^[34]和恶性黑色素瘤^[35]发病机制中占据中枢主导地位。最近也有研究证明IL-6与霍奇金淋巴瘤的危险系数相关^[36]。He G等人研究发现,肝癌HCC的恶性进展过程是IL-6依赖的^[37]。肿瘤相关巨噬细胞TAM可以通过分泌IL-6增强肿瘤干细胞(CSCs)的特征及肿瘤耐药^[38]。在乳腺癌中,IL-6可经由NF- κ B, Lin28和Let-7 miRNA组成的正反馈环来促使乳腺癌祖细胞向着干细胞方向转化^[39,40]。

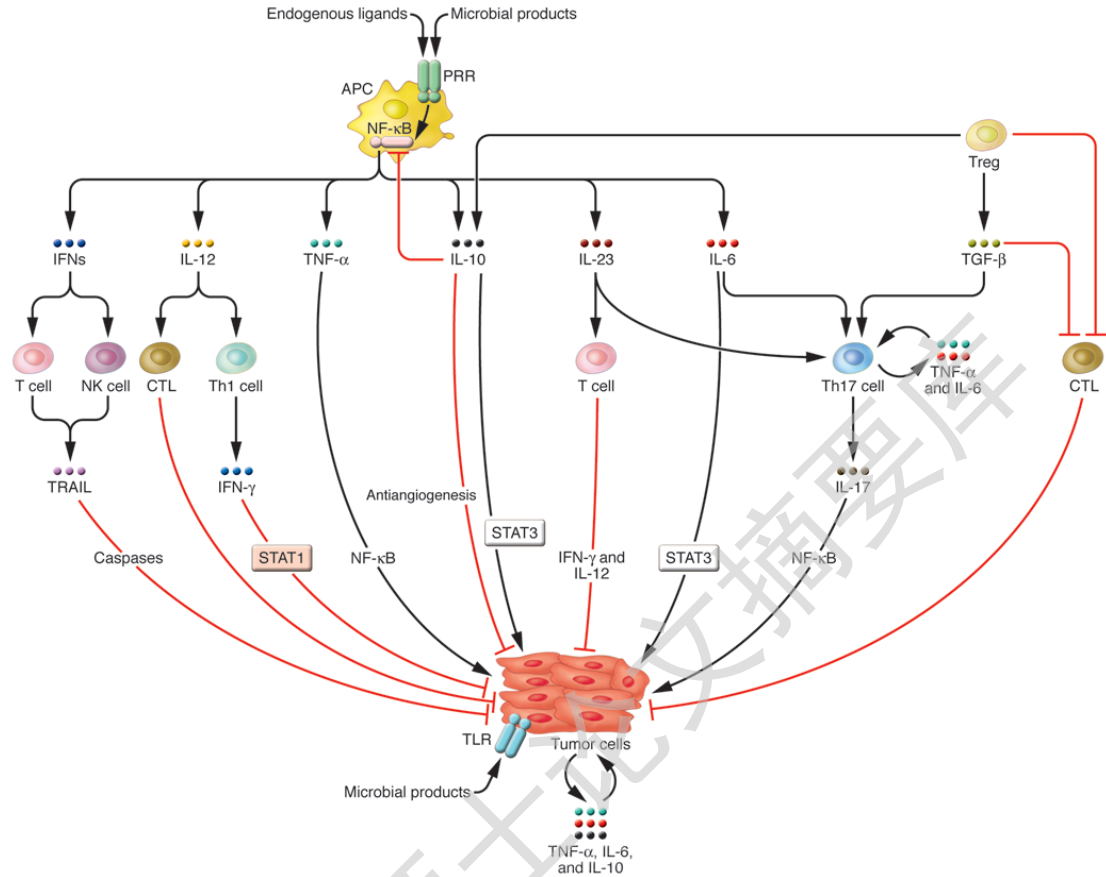


图 2.细胞因子促肿瘤发生发展示意图

(Wan-Wan Lin, JCI, 2007)

IL-6在肺癌的发生、发展和化疗耐药中亦发挥作用。表皮生长因子受体EGFR酪氨酸激酶的抑制剂埃罗替尼是目前应用于非小细胞肺癌(NSCLC)的有效化疗药之一。在炎症应答时产生的TGF-β可以大量诱导埃罗替尼抵抗的细胞并促进EMT发生及上调IL-6的表达。IL-6的表达上调可以使埃罗替尼抵抗的细胞增多,同时促进细胞存活^[41]。临床研究表明,针对IL-6的靶向治疗可以减轻非小细胞肺癌造成的贫血和恶病质^[42]。Li L等研究发现,抗糖尿病药物二甲双胍可以增强肺癌细胞对化疗药埃罗替尼和吉非替尼的敏感性,这个作用是通过逆转EMT作用及降低IL-6信号通路的活性来实现的^[43]。NOX4是肺癌细胞中活性氧产生的主要来源,可以促进NSCLC的进展, Juan L等发现,在肺癌组织中,IL-6与NOX4的表达阳性相关。NOX4/Akt通路的激活可以促进IL-6的产生及IL-6/STAT3通路在肺癌中的激活,促进肿瘤细胞的增殖和存活^[44]。在A549细胞中,脱嘌呤核酸内切酶APE1可以增强IL-6的表达,并激活IL-6/STAT3通路,上调抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xL,进而促进化疗耐药^[45]。IL-6-634(rs1800796)

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.